

Observations sur un cas d'hybridation interspécifique entre le *Phytophthora parasitica* DAST. et le *Phytophthora cinnamomi* RANDS

B. BOCCAS*

OBSERVATIONS SUR UN CAS D'HYBRIDATION
INTERSPECIFIQUE ENTRE LE *PHYTOPHTHORA PARASITICA*
DAST. ET LE *PHYTOPHTHORA CINNAMOMI* RANDS

B. BOCCAS (ORSTOM)

Fruits, jun. 1973, vol. 28, n°6, p. 445-451.

RÉSUMÉ - L'auteur examine les possibilités d'hybridation entre deux isolats du *P. parasitica* et du *P. cinnamomi* issus d'une même plantation. L'étude morphologique *in vitro* des spores sexuelles montre que les deux souches participent effectivement à la reproduction sexuelle ; et l'étude génétique met en évidence, dans la descendance, des recombinaisons entre les caractères des deux parents. Ces résultats indiquent que l'hybridation interspécifique est ici effective.

La reproduction sexuelle constitue pour les *Phytophthora* une importante source potentielle de variation génétique intraspécifique. Plusieurs études récentes (3, 8, 9), réalisées *in vitro*, l'ont démontré en mettant en évidence, chez différentes espèces, les échanges génétiques qui en résultent. Certaines informations recueillies sur le terrain (5) permettent en outre de penser que cette phase du cycle s'accomplit effectivement dans la nature, lorsque coexistent dans une même région les deux types sexuels d'une espèce. Mais cette dernière situation semble cependant peu fréquente en Afrique, où la présence simultanée de souches complémentaires d'une même espèce a rarement été signalée.

En revanche, la recherche de *Phytophthora* à l'intérieur d'une aire restreinte aboutit souvent à la récolte d'isolats mutuellement compatibles mais appartenant à des espèces distinctes. C'est ainsi, en particulier, que sur la station fruitière du Congo, à Loudima, nous avons pu isoler de l'oranger un *P. parasitica* compatible avec le *P. cinnamomi* qui parasite les vergers d'avocatsiers.

Malgré leurs affinités parasitaires différentes, il est vraisemblable que des rencontres entre ces espèces se produisent sur des substrats naturels dans les sols de la plantation dont le taux d'infestation est élevé.

L'éventualité de tels contacts entre souches sexuellement complémentaires et les croisements interspécifiques qui, théoriquement, peuvent en résulter, ont, sur le plan de l'évolution des aptitudes parasitaires de ces champignons, des conséquences pratiques et des implications agronomiques importantes.

L'hybridation interspécifique chez les *Phytophthora* reste cependant hypothétique. Le phénomène est fréquemment évoqué dans la littérature (2, 3, 6, 7), notamment par SAVAGE et al., (7), qui ont observé dans de nombreuses confrontations entre différentes espèces, la formation d'oospores bien constituées provenant de fusions gamétocystiques interspécifiques ; mais la viabilité des zygotes hybrides, et l'existence, dans leur descendance, de recombinaisons génétiques entre les caractères des espèces parentales n'ont pas, à notre connaissance, été démontrées.

Notre intention ici est donc de déterminer par une double étude, morphologique et génétique, si une hybridation est possible entre les souches du *P. cinnamomi* et du *P. parasitica* issues de la station de Loudima.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

La souche 570 du *P. parasitica*, isolée d'un oranger greffé sur mandarinier Cléopâtre appartient au groupe de compa-

* - Office de la Recherche scientifique et technique Outre-Mer, 70-74, route d'Aulnay, 93140 BONDY.

tibilité A₁. La souche 163 du *P. cinnamomi* provient des racines d'un avocatier Areu. Elle s'apparente au groupe A₂:

Ces deux isolats confrontés en boîte de Pétri sur un bouillon de pois gélosé, produisent à l'obscurité et à 26°C, des oospores dont 60 p. cent en moyenne sont morphologiquement bien constituées. Une méthode déjà décrite (4) permet de lever la dormance de ces spores et d'obtenir la germination d'un certain nombre d'entre elles. Cette germination intervient dans l'eau stérile où les oospores sont conservées après un broyage suivi d'une filtration de l'ensemble du mycelium. Les germinations surviennent dans les cinq jours suivants et toutes celles que nous avons observées ont emprunté la voie directe : émission de filaments générateurs d'un thalle, sans formation préalable de sporocystes et des zoospores. Le pourcentage de germination ainsi obtenu est proche de 5 p. cent.

Vingt deux lignées filles, d'origine mono-oospore ont été isolées et leurs caractères génétiques phénotypiques étudiés.

En les confrontant avec les souches parentales, nous avons déterminé le type de compatibilité de chacun des descendants avant d'évaluer leurs aptitudes pathogéniques à l'égard de quatre plantes-hôtes : L'avocatier, le «Rough lemon», le pomelo et la roselle (*Hibiscus sabdariffa*), une espèce habituellement utilisée au laboratoire de Brazzaville pour différencier les isolats de *Phytophthora*.

Dans tous les essais, les souches ont été inoculées par apport d'un broyat mycelien dans l'eau au pied de jeunes plants croissants sur vermiculite imbibée de milieu minéral.

Chaque lignée a été inoculée à cinq avocats, quinze «Rough lemon» et autant de pomelos, ainsi qu'à deux séries de dix plantules de roselle. Chez les trois premières espèces les sujets testés étaient âgés d'un mois à l'inoculation et de trois mois en fin d'expérience. Chez la roselle, les plantules infestées étaient âgées de dix jours et les résultats furent relevés douze jours après l'inoculation, terme au-delà duquel les symptômes n'évoluent plus.

Suivant la même méthode, E. LAVILLE a testé les souches-mères et certaines lignées filles sur mandarinier, bigaradier, *Poncirus trifoliata* et «Rough lemon».

Un autre type d'inoculation a également été tenté. Un fragment de mycelium de chacune des souches a été introduit sous l'écorce de «Rough lemon» vieux de trois ans, par une incision corticale pratiquée au collet. Afin d'assurer au parasite les meilleures conditions d'installation, les blessures infectées furent recouvertes d'un coton humide maintenu par une enveloppe de pâte à modeler, et les arbres inoculés furent abondamment irrigués pendant la durée de l'expérience.

LES RÉSULTATS ET LEUR INTERPRÉTATION

La production d'oospores du croisement 570 x 163, qui permet, en première analyse, d'évaluer sa fertilité a été mesurée et comparée à celle de croisements intraspécifiques impliquant les souches 163 et 570. Ces productions sont quantitativement et qualitativement différentes.

Sur le plan quantitatif, le nombre des oospores formées dans le croisement interspécifique est inférieur à celui des croisements intraspécifiques. Nous avons relevé les chiffres suivants : 355 oospores par mm³ de milieu dans le croisement entre souches du *P. parasitica*, 25 oospores/mm³ chez le *P. cinnamomi* et 7 oospores/mm³ dans le croisement des deux espèces.

Sur le plan qualitatif, deux types de spores sexuelles apparaissent dans la confrontation 163 x 570. Les oospores du premier type, les plus nombreuses (70 p. cent), ont un diamètre moyen de 26μ (20 - 32,5μ). Elles sont semblables aux spores observées dans les croisements entre isolats du *P. parasitica* (photo 1). Les oospores du second type sont de plus grande taille, d'un diamètre moyen de 36,8μ, et se distinguent en outre des premières par un pédoncule oogonial plus long et plus largement évasé (photos 2 et 3). Elles sont identiques aux oospores des croisements entre souches du *P. cinnamomi*. Ces observations montrent qu'au sein du croisement 163 x 570, les oospores du premier type proviennent de la fécondation d'oogones produites par la souche 570, et les oospores du second type d'oogones issues de la souche 163.

Les tentatives visant à identifier de la même manière, sur des critères morphologiques, l'origine des anthéridies n'ont pas abouti. Il semble en effet que la forme et taille d'un gamétocyste mâle dépendent des dimensions du pédoncule de l'oogone qu'il féconde, plutôt que de son origine spécifique.

L'étude morphologique, tout en montrant que les deux confrontants participent à la formation des spores sexuelles en fournissant des oogones, ne permet pas en revanche de définir si les oospores sont réellement hybrides ou issues de l'autofécondation de chacune des deux souches parentales. L'autofécondation est maintenant un phénomène connu chez de nombreuses espèces (2), et son intervention dans le cas présent ne peut pas être exclue a priori. En effet, la gamétocystie tardive et la médiocre fertilité du croisement indiquent que l'affinité sexuelle des deux souches est faible. De même, la proportion importante (40 p. cent) d'oospores mal constituées et de loges oogoniales vides résultant de zygotes avortés reflètent vraisemblablement une certaine incompatibilité génétique entre les souches. Dans ces conditions, il n'est pas illogique de penser que la formation d'oospores issues d'autofécondation puisse être favorisée, et que les germinations observées soient précisément celles de ces zygotes autofécondés.

Cette incertitude nous a conduit à examiner la répartition des caractères génétiques dans la descendance des oospores germinantes. Les résultats de cette étude figurent dans les tableaux 1 et 2 et sur la figure 1.

Il apparaît tout d'abord que les aptitudes pathogéniques des souches parentales sont différentes. La souche 570, virulente à l'égard de la roselle et de toutes les variétés de Citrus testées, manifeste cependant envers ces derniers divers degrés d'agressivité, dont la plus forte s'exerce chez le «Rough lemon». La souche 163 est pathogène pour l'avocatier mais n'attaque aucune des autres plantes aux-

TABLEAU 1 - Compatibilité et pathogénie des lignées filles à l'égard des plantules d'avocatier et de Citrus.

N°souche	compatibilité	Rough lemon	pomelo	avocatier	mandarinier*	bigaradier*	<i>P. trifoliata</i>	Rough lemon*
P 570	A1	***	●	0	***	-	●	***
P 163	A2	0	0	***	0	-	0	0
1	A1	**	●	●	***	0	0	0
2	A2	0	0	**	0	-	0	0
3	A1	**	●	0	-	-	-	-
4	A2	●	0	**	-	-	-	-
5	A1	***	●	**	***	-	0	***
6	A1	●	0	0	-	-	-	-
7	A1	●	0	0	***	-	0	***
8	A2	●	●	0	0	0	0	0
9	A1	●	●	●	-	-	-	-
10	A1	0	0	**	-	-	-	-
11	A1	0	0	**	0	0	0	●
12	A1	0	0	0	-	-	-	-
13	A1	**	●	0	-	-	-	-
14	A1	●	●	0	***	-	0	●
15	A1	**	0	0	-	-	-	-
16	A2	●	0	●	0	0	0	●
17	A2	**	0	***	-	-	-	-
18	A1	**	0	**	0	0	0	0
19	A1	***	●	0	-	-	-	-
20	A2	**	●	**	-	-	-	-
21	A2	***	●	●	-	-	-	-
22	A2	0	●	**	0	**	0	0

*** - forte attaque avec mort du plant ou altération profonde de l'aspect végétatif.

** - attaque moyenne avec nécroses racinaires et jaunissement du feuillage.

● - attaque faible ; traces de nécroses cicatrisées, aspect végétatif subnormal.

0 - pas d'attaque.

- non testé.

* - essais réalisés par E. LAVILLE.

TABLEAU 2 - Pathogénie à l'égard du citronnier «Rough lemon». Inoculation sur blessure.

Souches	P 570	P 163	1*	2	3	4*	5	6	7	8*	9	10
Pouvoir pathogène	***	0	●	0	**	0	●	***	***	0	***	●
souches	11	12	13	14	15	16*	17*	18	19	20*	21*	22*
Pouvoir pathogène	●	***	***	**	***	●	0	0	***	●	0	●

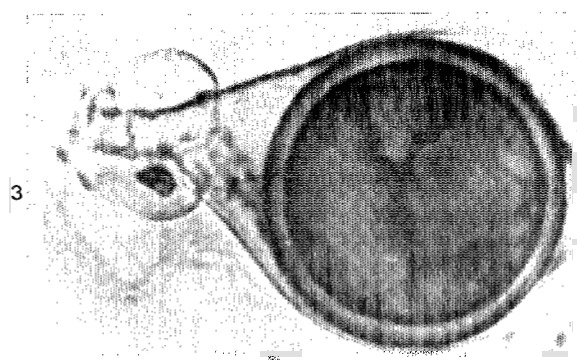
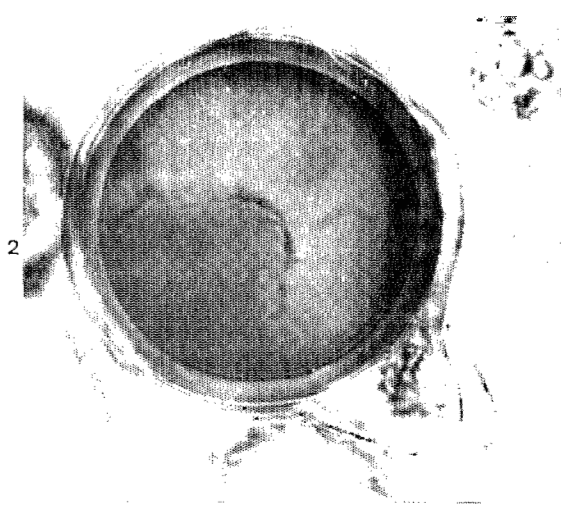
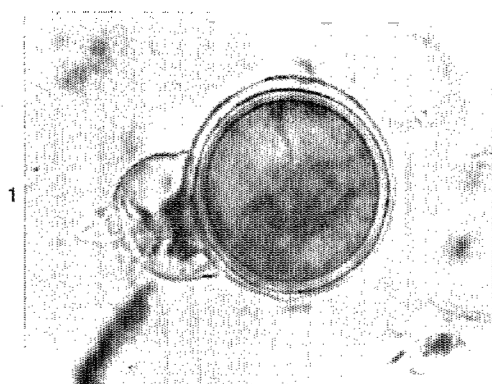
*** - forte attaque avec chancre étendu et exsudat gommeux abondant (photos 4 et 5)

** - attaque moyenne avec nécrose moins étendue (photos 6 et 7)

● - attaque faible avec léger brunissement (photo 8)

0 - pas d'attaque (photos 9 et 10)

* - souches de type A2.



Photos 1, 2 et 3. Types d'oospores observées dans le croisement 163 x 570.

1. Oospore de type *P. parasitica*.

2 et 3. Oospores de type *P. cinnamomi*.

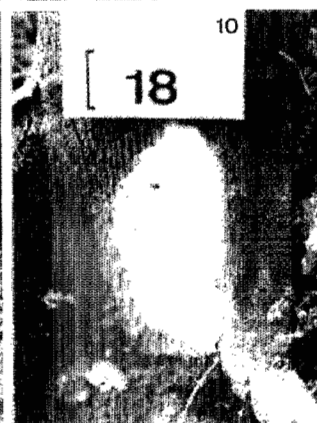
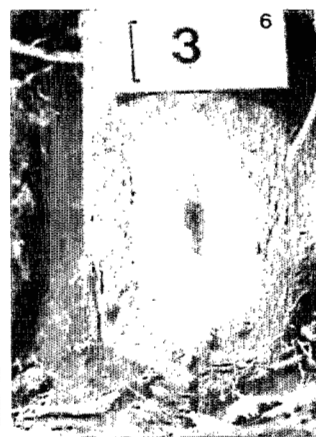
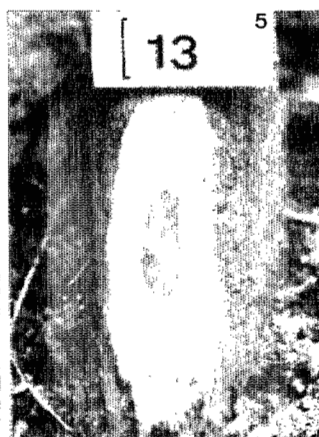
Photos 4 à 10. Nécroses provoquées en un mois sur 'Rough lemon' inoculés par blessure du collet.

4 et 5. Forte attaque.

6 et 7. Attaque moyenne.

8. Attaque faible.

9 et 10. Pas d'attaque.



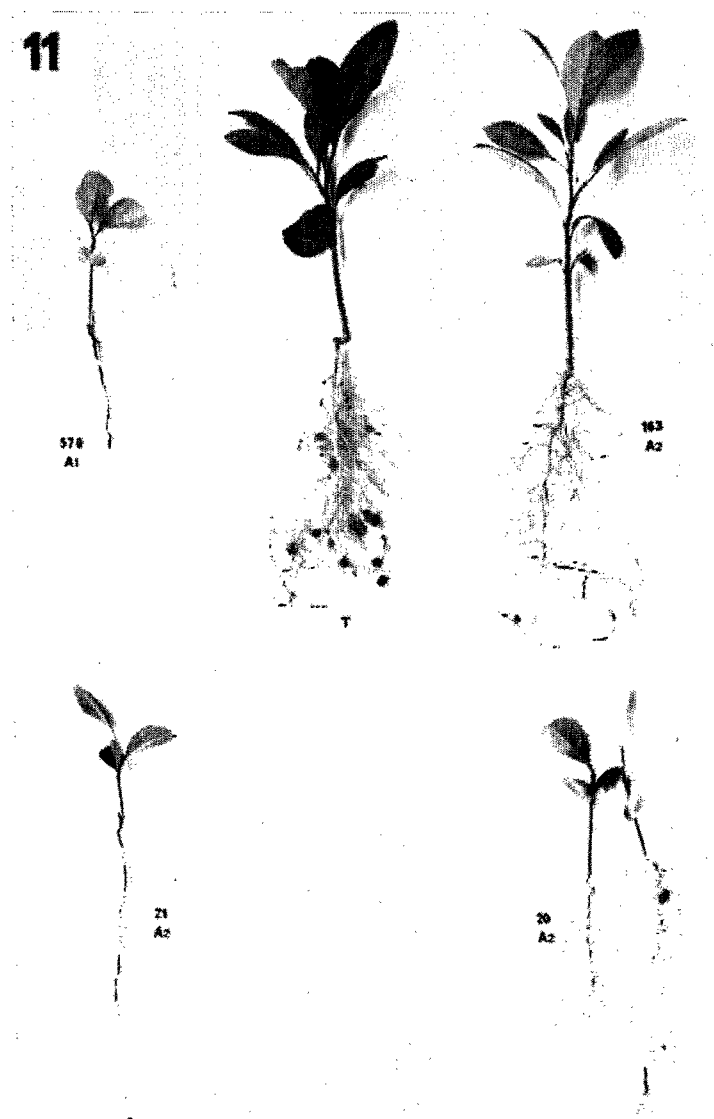


Photo 11. Aspect présenté par les plantules de 'Rough lemon' deux mois après leur inoculation par les souches parentales 163 et 570, et par deux descendants possédant la compatibilité de la souche 163.

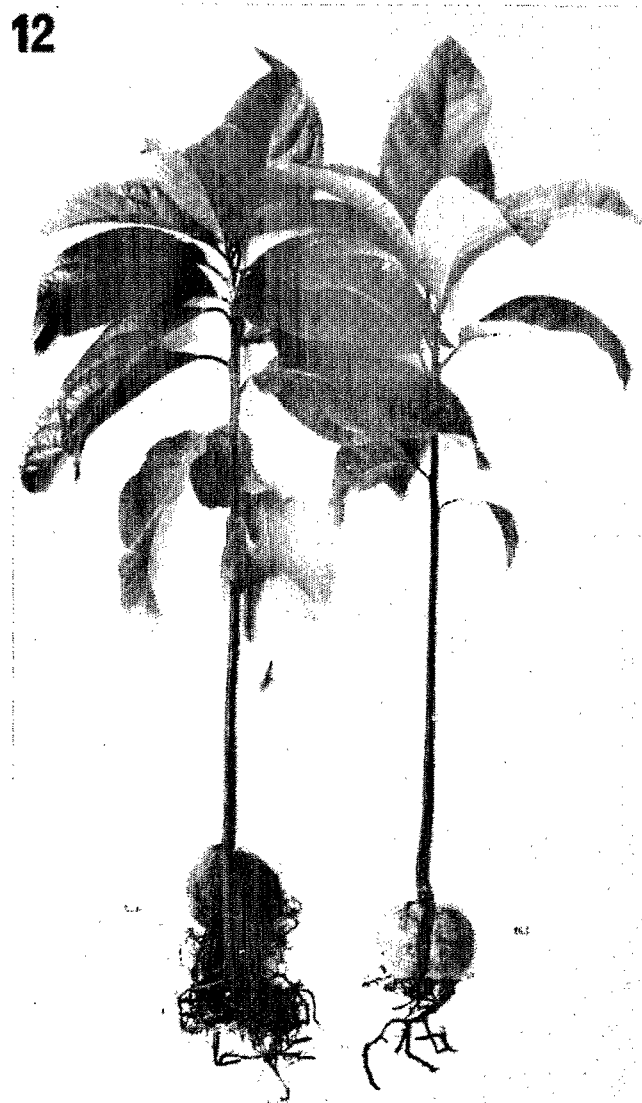


Photo 12. Symptômes déterminés par les souches 163 et 570 sur de jeunes avocats deux mois après l'inoculation. On notera la profonde altération du système racinaire du plant attaqué par la souche 163.

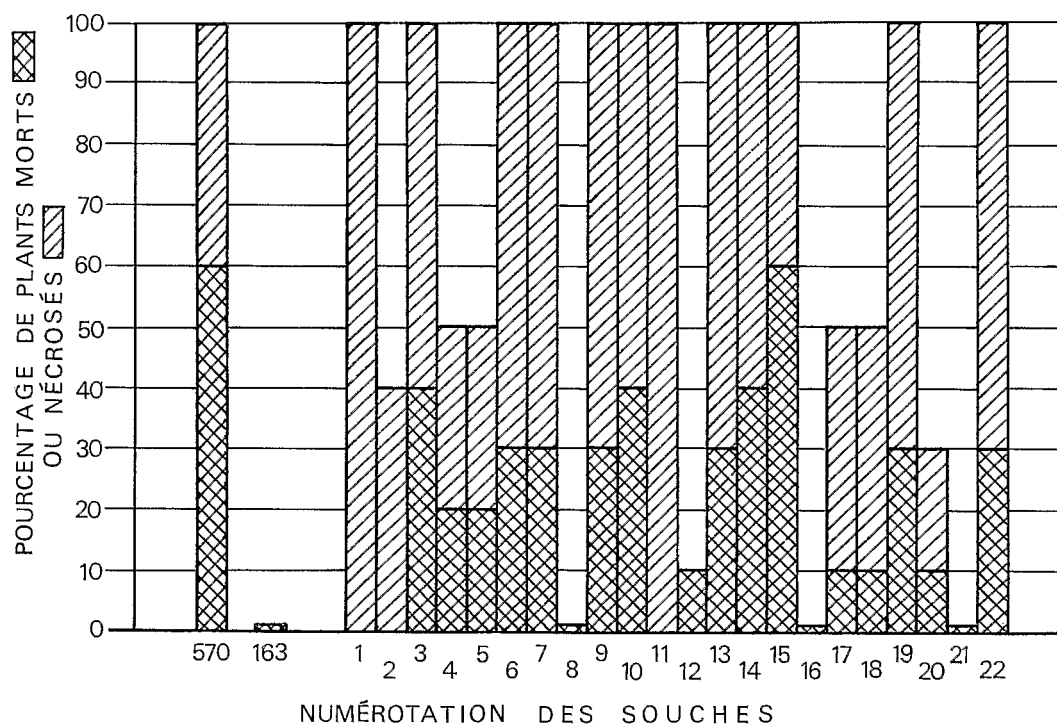


Figure 1 • Agressivité des souches mères et des lignées filles à l'égard de jeunes plants de roselle. Résultats observés en fin d'évolution, 12 jours après inoculation.

quelles nous l'avons confrontée. Les photos 11 et 12 illustrent les symptômes provoqués par les deux souches sur «Rough lemon» et avocatier.

Pour la descendance, la ségrégation de ces caractères pathogéniques et de la compatibilité conduit aux constatations suivantes.

En premier lieu nous remarquerons que certaines lignées filles manifestent des recombinaisons entre les caractères des souches parentales. Il s'agit des lignées 1, 10, 11 et 18 qui possèdent la compatibilité de 570 (A₁), tout en étant capable d'attaquer l'avocatier (tableau 1). Il s'agit aussi des lignées 4, 8, 16, 17, 20, 21 et 22 qui associent la compatibilité de 163 (A₂) à divers degrés d'agressivité envers les Citrus (photo 11). Il s'agit enfin des lignées 2, 4, 17, 20 et 22 de type A₂ et pathogènes pour la roselle.

L'existence de ces descendants aux caractères recombinés implique des échanges génétiques entre les souches parentales au cours de la reproduction sexuelle et démontre ainsi la réalité de l'hybridation. Cela permet également d'écarter l'hypothèse antérieure d'une germination exclusive des zygotes issus d'autofécondation.

En second lieu, nous noterons l'importante diversité phénotypique des descendants. Diversité qui se manifeste sur deux plans :

D'abord au niveau du comportement de l'ensemble des souches à l'égard d'une même plante-hôte. Toutes les situations existent, de la plus forte agressivité à l'avirulence : c'est le cas chez le Rough lemon, l'avocatier (tableau 1) et la roselle (figure 1).

Ensuite au niveau du comportement individuel de chaque souche envers les différentes espèces de la gamme d'hôtes : il n'est pas deux lignées filles qui manifestent le même potentiel à l'égard de l'ensemble des plantes tests, et toutes les possibilités s'observent, de la souche 5, agressive pour tous les hôtes, à la souche 12 dépourvue d'agressivité (tableau 1).

Cette double hétérogénéité phénotypique suggère deux hypothèses. La première est que vraisemblablement le support génétique du pouvoir pathogène à l'égard de chacune des plantes tests est polygénique. La seconde est que l'agressivité à l'égard des différents hôtes, notamment des divers Citrus, ne repose pas exactement sur les mêmes gènes ou les mêmes associations de gènes, puisque des aptitudes associées chez les parents peuvent se dissocier dans la descendance.

Il faut cependant accueillir ces informations avec une certaine réserve, car nos résultats, obtenus sur des populations de plantes-hôtes insuffisamment nombreuses et dont

l'homogénéité génétique est douteuse, n'ont pas de signification statistique. Les données du tableau 2, en particulier, n'ont qu'une valeur indicative car un seul sujet par souche a été testé.

Le troisième aspect des résultats qui retiendra notre attention réside dans la diminution de l'agressivité de la plupart des descendants par rapport à celle des souches parentales. Tout se passe comme si les facteurs d'agressivité rassemblés chez les souches-mères se dispersaient au cours de la reproduction sexuelle. Cette érosion de l'agressivité chez les hybrides, si elle se produit dans la nature, doit réduire l'incidence pratique d'éventuelles hybridations interspécifiques. Mais on ne peut pas exclure que ce phénomène soit ici la conséquence des circonstances expérimentales : la germination *in vitro* provoque probablement une sélection des oospores les mieux adaptées au milieu de culture. Il est logique de penser que, dans des conditions naturelles, des facteurs de sélection différents favorisent au contraire l'expression des génomes hybrides les plus agressifs. De ce fait, malgré les résultats présents, la possibilité d'une concentration des facteurs d'agressivité chez certains hybrides ne doit pas être écartée, surtout si le cycle du champignon est diploïde, ainsi que divers travaux tendent à l'indiquer (1, 8).

CONCLUSION

L'ensemble de ces résultats montre qu'une hybridation est possible entre le *P. parasitica* et le *P. cinnamomi*.

Malgré une interfertilité réduite, les deux isolats de Loudima sont capables de produire *in vitro* des descendants recombinant les caractères des souches-mères. Ces recombinaisons peuvent concerner les caractères pathogéniques et certains hybrides extériorisent un potentiel parasitaire qui recouvre effectivement les gammes des deux espèces. Les implications pratiques de ce phénomène peuvent être importantes dans la mesure où l'éventualité de sa réalisation dans la nature n'est pas négligeable. Et elle ne l'est pas, puisque des infections mixtes, par les deux souches, de fruits divers tels qu'oranges ou avocats, ont révélé que des oospores se forment *in vitro* sur ces supports naturels qui abondent sur les sols infestés des vergers de la Station fruitière.

Les conséquences de cette étude dépassent cependant le plan local. Des situations comparables à celle de Loudima sont fréquentes en culture fruitière, et le risque potentiel d'hybridation entre espèces distinctes aux affinités parasitaires différentes accroît la faculté d'adaptation et de variation génétique des populations de *Phytophthora*. Peut-être est-ce là un facteur nouveau dont il serait bon de tenir compte dans les futures recherches sur la résistance à ces parasites ?

BIBLIOGRAPHIE

- 1 - BOCCAS (B.). 1972.
Contribution à l'étude du cycle chez les *Phytophthora*.
C.R. Acad. Sc. Paris, 275 D, 663-666.
- 2 - BRASIER (C.M.). 1972.
Observations on the sexual mechanism in *P. palmivora* and related species.
Trans. Br. Mycol. Soc., 58 (2) 237-251.
- 3 - GALLEGLY (M.E.). 1968.
Genetics of pathogenicity of *Phytophthora infestans*.
Annual Review of Phytopathology, vol. 6, 375-396.
- 4 - HUGUENIN (B.) et BOCCAS (B.). 1971.
Rôle de quelques facteurs sur la reproduction sexuelle et la germination des oospores du *P. palmivora*.
Ann. Phytopathol., 3, 353-371.
- 5 - HUGUENIN (B.) et BOCCAS (B.). 1971.
Rapport de mission au Cameroun.
Document ORSTOM, Centre de Brazzaville.
- 6 - LAVIOLA (C.) et GALLEGLY (M.E.). 1967.
Heterothallism in *Phytophthora citrophthora*.
Phytopathology, 57, 7, 646.
- 7 - SAVAGE (E.J.), CLAYTON (C.W.), HUNTER (J.H.), BRENNEMAN (J.A.), LAVIOLA (C.) and GALLEGLY (M.E.). 1968.
Homothallism, heterothallism and interspecific hybridization in the genus *Phytophthora*.
Phytopathology, 58, 7, 1004-1021.
- 8 - SHAW (D.S.) and KHAKI (I.A.). 1971.
Genetical evidence for diploidy in *Phytophthora*.
Genet. Reg. Camb., 17, 165-167.
- 9 - TIMMER (L.W.), CASTRO (J.), ERWIN (D.C.), BELSER (W.L.) and ZENTMYER (G.A.). 1970.
Genetic evidence for zygotic meiosis in *P. capsici*.
Amer. J. Bot., 57 (10), 1211-1218.

